

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

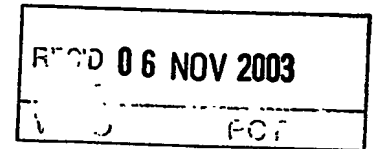
21.10.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月 9日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-263412
[ST. 10/C]: [JP2002-263412]



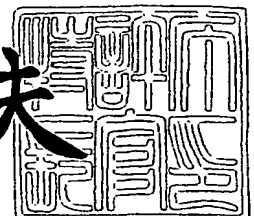
出 願 人
Applicant(s): 科学技術振興事業団
鹿児島大学長

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3084360

【書類名】 特許願

【整理番号】 P028-P01

【提出日】 平成14年 9月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07C211/00

C07K 1/107

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市下伊敷 1 - 1 3 - 1 - 1 0 6

【氏名】 隅田 泰生

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市唐湊 1 - 1 5 - 1 1 - 8 0 1

【氏名】 荒野 明男

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市半町 3 - 5, C - 1 1 4

【氏名】 楠本 正一

【発明者】

【住所又は居所】 アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 7 7, シアトル
 , ノース ウェスト シックス アベニュー 1 3 0
 1 4

【氏名】 マイケル ソーベル

【特許出願人】

【持分】 060/100

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【持分】 040/100

【識別番号】 391012523

【氏名又は名称】 鹿児島大学長

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 12,600円

【その他】 国以外のすべての者の持分の割合 0 6 0 / 1 0 0

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

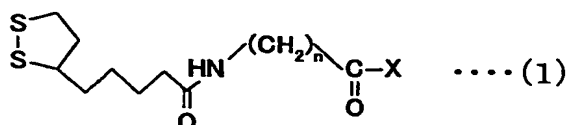
【発明の名称】 リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (1)

【化 1】



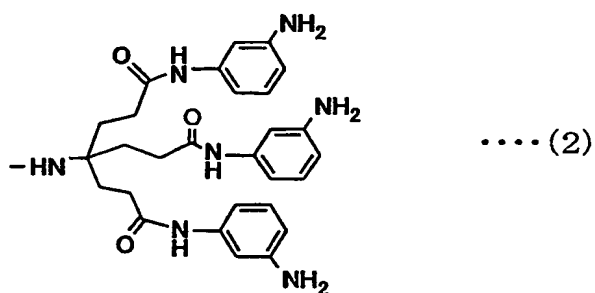
(式中、n は 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備え、

上記 X が、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、3 鎖又は 4 鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備えていることを特徴とするリンカー化合物。

【請求項 2】

上記 X は、一般式 (2)

【化 2】

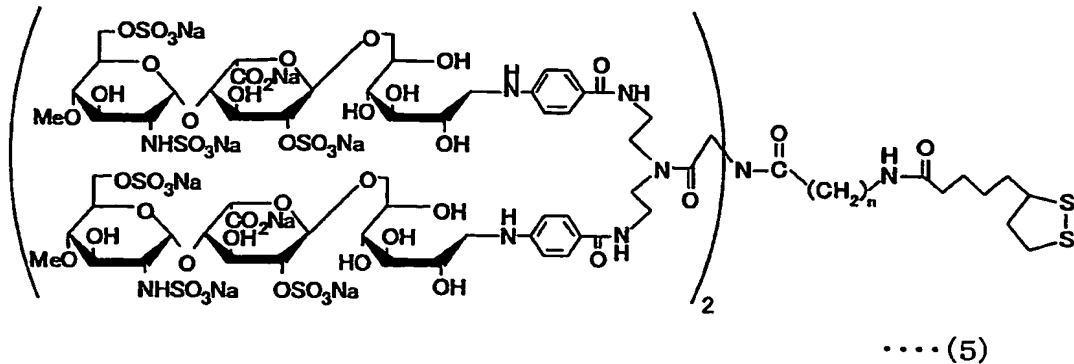


にて表される構造を備えていることを特徴とする請求項 1 記載のリンカー化合物

【請求項 3】

上記 X は、一般式 (3)

【化 5】



(式中、 n は 1 以上 6 以下の整数) にて表される構造を備えていることを特徴とするリガンド。

【請求項 7】

チオクト酸と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を 3 鎖又は 4 鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと、

上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでいることを特徴とするリンカー化合物の製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のリンカー化合物と、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを特徴とするリガンドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、表面プラズモン共鳴のセンサチップ等のタンパク質分析用の支持体にオリゴ糖等の糖を固定することが可能なリンカー化合物、及び該リンカー化合物に糖を導入してなるリガンド、並びにこれらの製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

生体内に存在する種々の糖は、生物の活動や生命を維持するためのメカニズムの中で重要な役割を果たしている。このような糖の機能を解明するためには、糖の複雑な構造を解析する必要がある。糖の構造解析には、構造が解明されている

オリゴ糖を用いて、糖の構造を一部ずつ再現し、これによって糖の全体構造を明らかにする手法が用いられる。

【0003】

上記糖の構造解析には、例えば、表面プラズモン共鳴（以下、SPRと記載する）が知られている。すなわち、糖の一部を模擬したオリゴ糖を含んでなるリガンドをセンサチップ表面上に導入し、このリガンドが導入されてなるセンサチップを用いて、オリゴ糖と特異的に相互作用するタンパク質等の物質を特定する。これにより、オリゴ糖の構造に基づく生物活性の正しい評価を行うことができる。

【0004】

ところが、オリゴ糖は、1分子だけでは活性がそれほど高くないため、オリゴ糖の生物活性を評価する場合には、オリゴ糖をセンサチップ上に集合化させることが必要となる。つまり、集合化したオリゴ糖を用いて、タンパク質との相互作用を解析することにより、オリゴ糖の生物活性の評価を行うことが可能になる。

【0005】

そこで、本発明者らは、これまでに、センサチップ表面に固定可能な部位及びオリゴ糖を導入可能な部位を分子内に有するリンカー化合物を得、このリンカー化合物に1単位又は2単位のオリゴ糖を導入してなるリガンドを得ている。そして、このリガンドを用いることによって、センサチップ上に、オリゴ糖を集合化して導入することができることを見出している（例えば、非特許文献1等を参照）。

【0006】

【非特許文献1】

「日本化学会第79回春季年会－講演予稿集II」、社団法人日本化学会、2001年3月15日、p. 1042

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記非特許文献1に記載のリガンドでは、オリゴ糖の糖鎖をセンサチップ表面に2次元的に配列させることは可能であるが、その配列を再現性

よく得ることが困難であるという技術的課題が残されている。

【0008】

すなわち、上記のように、センサチップ表面に複数分子のオリゴ糖を集合化させ、オリゴ糖の生物活性を解析する場合には、オリゴ糖の糖鎖の集合化状態を同一にし、オリゴ糖とタンパク質との間の相互作用を再現性よく観測することが求められる。特に、オリゴ糖の生物活性を観測するためには、センサチップ表面に3単位～4単位のオリゴ糖を集合化し、これらのセンサチップ上にて再現性よく2次元的に配列させることによって、オリゴ糖の生物活性を再現性よく評価することが重要になる。

【0009】

ところが、上記非特許文献1に記載のリガンドでは、1つのリガンドが有するオリゴ糖は1単位又は2単位となっている。言い換えれば、上記のリガンドは、1つのリンカー化合物に対して、1つ又は2つのオリゴ糖が結合してなるものである。そのため、オリゴ糖の生物活性を観測するためには、上記リガンドをセンサチップ表面に配列させる際に、リガンド濃度を高めてリガンド同士を集合化させることによって、センサチップ表面上に3単位以上のオリゴ糖を集合化させる必要がある。

【0010】

このような手法によってオリゴ糖を集合化させた場合、オリゴ糖の糖鎖間を所定の間隔にて制御してオリゴ糖の配列を再現性よく得ることは困難である。それゆえ、上記従来のリガンドでは、オリゴ糖の生物活性を再現性よく観測することができず、糖の構造の解明や、オリゴ糖の生物活性の評価を行う場合に困難を伴う可能性がある。

【0011】

本発明は、上記の課題を解決するためになされたものであって、その目的は、センサチップ表面上にオリゴ糖を再現性よく2次元的に配列し得る新規なリンカー化合物、及び、該リンカー化合物に糖分子が導入されてなる新規なリガンド、並びにこれらの製造方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

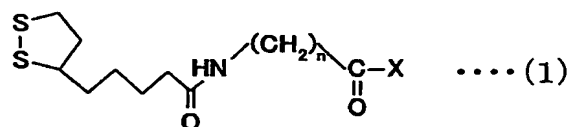
本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、3単位又は4単位の糖分子を導入可能な部位を有し、かつ、表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサチップやアフィニティクロマトグラフィの担体等のタンパク質分析用の支持体に結合可能な部位を有する新規なリンカー化合物を用いることによって、上記支持体に3単位又は4単位の糖分子を再現性よく2次元的に配列させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0013】

すなわち、本発明のリンカー化合物は、上記の課題を解決するために、一般式（1）

【0014】

【化6】



【0015】

（式中、nは1以上6以下の整数）にて表される構造を備え、上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素－窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、3鎖又は4鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備えていることを特徴としている。

【0016】

上記炭化水素誘導鎖とは、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が、他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものを指すものとする。すなわち、上記炭化水素誘導鎖とは、末端に芳香族アミノ基を有し、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素－炭素結合（C－C結合）の一部が炭素－窒素結合（C－N結合）やアミド結合（CO－NH結合）に置き換わっていてもよいものを指す。

【0017】

上記の構成によれば、上記リンカー化合物は、糖分子を簡便に導入できる部位

として、芳香族アミノ基を有している。上記芳香族アミノ基は、各炭化水素誘導鎖に含まれているので、上記リンカー化合物には、3単位又は4単位の糖分子を導入することができる。また、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位として、S-S結合を有している。

【0018】

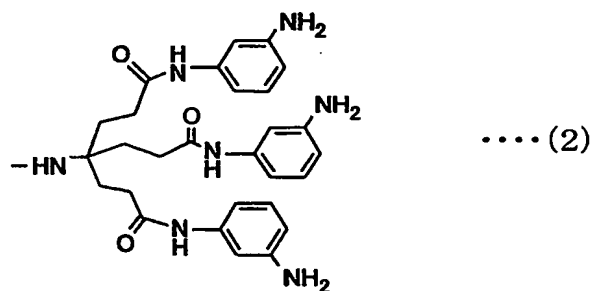
従って、上記リンカー化合物を介して、上記支持体に3単位又は4単位の糖分子を集合化させて導入することができる。また、3単位又は4単位の糖分子が1つのリンカー化合物に導入されているので、上記支持体表面に、3単位又は4単位の糖分子を再現性よく配列させることができる。これにより、上記支持体表面上にて、糖分子とタンパク質との相互作用の観測が可能になるとともに、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0019】

上記一般式(1)にて表される構造を備えているリンカー化合物において、上記Xは、一般式(2)

【0020】

【化7】



【0021】

にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0022】

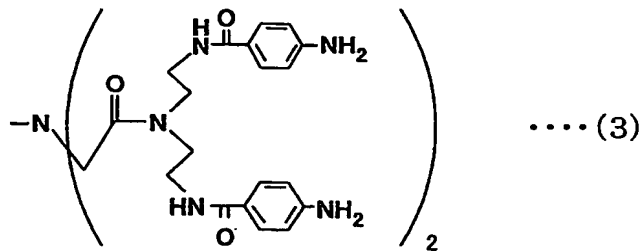
上記リンカー化合物のXは、上記炭化水素誘導鎖を3鎖有しているので、このリンカー化合物を介して、上記支持体上に3単位の糖分子を導入することが可能である。そのため、上記支持体表面上にて3単位の糖分子間の間隔を制御して、糖分子の配列を再現性よく得ることができるので、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0023】

また、上記一般式(1)にて表される構造を備えているリンカー化合物において、上記Xは、一般式(3)

【0024】

【化8】



【0025】

にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0026】

上記リンカー化合物のXは、上記炭化水素誘導鎖を4鎖有しているので、このリンカー化合物を介して、上記支持体上に4単位の糖分子の導入が可能である。そのため、上記支持体表面にて4単位の糖分子間の間隔を制御して、糖分子の配列を再現性よく得ることができるので、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0027】

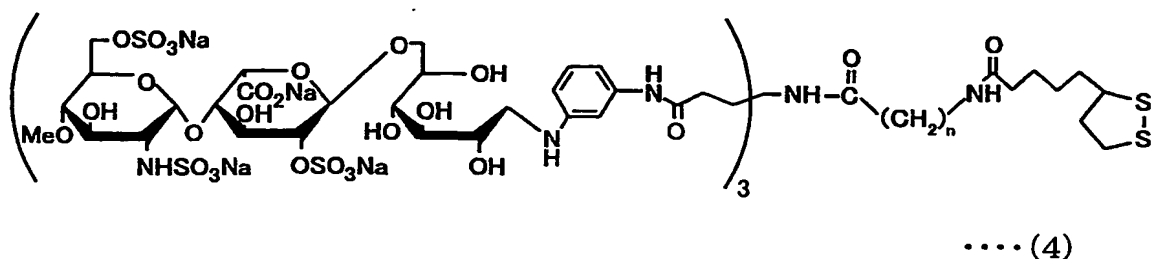
また、本発明のリガンドは、上記の課題を解決するために、上記したいずれかのリンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子を導入してなるものであることを特徴としている。

【0028】

上記リガンドは、具体的には、一般式(4)

【0029】

【化9】



【0030】

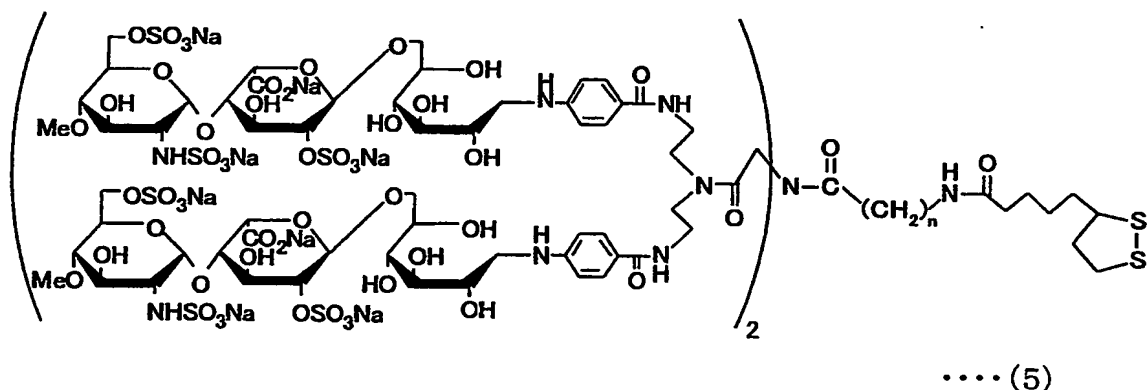
(式中、nは1以上6以下の整数) にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0031】

あるいは、上記リガンドは、一般式(5)

【0032】

【化10】



【0033】

(式中、nは1以上6以下の整数) にて表される構造を備えていることが好ましい。

【0034】

上記リガンドのいずれかを用いることにより、上記タンパク質分析用の支持体表面に3単位(一般式(4))に示される構造を備えているリガンドを用いた場合)又は4単位(一般式(5))に示される構造を備えているリガンドを用いた場合)の糖分子を集合化して固定化することができる。このように、一つのリガンドが3単位又は4単位の糖分子を有しているので、上記リガンド同士を集合化する

ことなく、一つのリガンドを用いることによって、3単位又は4単位の糖分子を集合化させることができるので、糖分子の生物活性を測定することが可能になる。また、上記支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列することができる。従って、本発明のリガンドが固定されてなるタンパク質分析用の支持体を用いることによって、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0035】

また、本発明のリンカー化合物の製造方法は、上記の課題を解決するために、チオクト酸と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を3鎖又は4鎖有するアミン化合物との縮合反応を行うステップと、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護するステップとを含んでいることを特徴としている。

【0036】

上記の方法によれば、上記タンパク質分析用の支持体に固定可能な部位としてのS-S結合と、糖分子を簡便に導入できる部位としての芳香族アミノ基とを有している、本発明のリンカー化合物を得ることができる。

【0037】

また、本発明のリガンドの製造方法は、上記の課題を解決するために、上記のリンカー化合物と、糖分子とを用いて、還元アミノ化反応を行うことを特徴としている。

【0038】

上記の方法によれば、還元アミノ化反応により、リンカー化合物に簡便に糖分子を導入して、本発明のリガンドを得ることができる。

【0039】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0040】

本発明のリンカー化合物は、表面プラズモン共鳴（SPR）のセンサチップやアフィニティクロマトグラフィの担体等のタンパク質分析用の支持体とオリゴ糖等の糖（以下、糖分子と記載する）との間に介在して、上記支持体上に糖分子を

固定化するために用いられる。そのため、上記リンカー化合物は、上記支持体に固定可能な部位、及び、糖分子を簡便に導入できる部位を分子内に有している必要がある。

【0041】

また、上記SPRやアフィニティクロマトグラフィでは、糖分子と特異的に相互作用するタンパク質等の物質を特定することや分離することを目的としている。そのため、上記リンカー化合物は、タンパク質等の物質との非特異的な相互作用を有していないものでなければならない。

【0042】

そこで、本発明のリンカー化合物は、上記支持体に固定可能な部位として、前記一般式(1)にて示すように、ジスルフィド結合(S-S結合)を有している。このジスルフィド結合の硫黄(S)は、例えば、タンパク質分析用の支持体表面にコートされた金(Au)と、硫黄-金結合(S-Au結合)を形成し、上記支持体に強固に結合することができる。

【0043】

また、上記リンカー化合物は、タンパク質分析用の支持体表面に2次元的に複数の糖分子を配列するとともに、個々の糖分子の糖鎖間の距離を制御するために、糖分子を簡便に導入できる部位として、複数のアミノ基を含んでなる多分岐部位を有している。すなわち、本発明のリンカー化合物の多分岐部位は、前記一般式(1)のXで表される構造を備えている部位であり、該Xは、前記したように、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合やアミド結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を3鎖又は4鎖含んでいる構造を備えている。

【0044】

上記芳香族アミノ基のアミノ基(-NH₂基)は、オリゴ糖等の糖分子との還元アミノ化反応により、上記リンカー化合物に糖分子を導入するための反応基となる。つまり、糖分子中の平衡によって生じるアルデヒド基(-CHO基)又はケトン基(-CRO基、Rは炭化水素基)と、上記リンカー化合物が有するアミノ基とが反応する。そして、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に容易に糖分子を導入することができる。

【0045】

従って、前記一般式(1)のXは、上記のような炭化水素誘導鎖を3鎖又は4鎖含むことにより、糖分子を導入可能な芳香族アミノ基を複数併せ持った多分岐型部位である構造を備えている。この多分岐型部位に含まれる各芳香族アミノ基に、オリゴ糖等の糖分子が導入されるので、前記一般式(1)にて表される構造を備えているリンカー化合物を介して、タンパク質分析用の支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列することが可能になる。

【0046】

具体的には、上記Xは、前記一般式(2)にて示すように、3鎖の炭化水素誘導鎖が、芳香族アミノ基とは反対側の末端にて、1つの炭素(C)に結合することによって分岐構造を形成している。そして、この炭素に-NH-が結合している。これにより、上記Xは、3鎖の炭化水素誘導鎖を備えた多分岐型部位となる。

【0047】

あるいは、上記Xは、前記一般式(3)にて示すように、2鎖の炭化水素誘導鎖が、芳香族アミノ基とは反対側の末端にて、1つの窒素(N)に結合した2分岐構造を2つ有している構造を備えていてもよい。この場合、2つの2分岐構造の上記窒素が、-CO-CH₂-を介して、1つの窒素(N)に結合することによって分岐構造を形成する。これにより、上記Xは、4鎖の炭化水素誘導鎖を備えた多分岐型部位である構造を備えることになる。

【0048】

このように、上記Xは、炭素や窒素等の原子にて、上記炭化水素誘導鎖を複数結合して分岐構造を形成している多分岐型部位である構造を備えている。なお、上記Xに含まれる複数の炭化水素誘導鎖は、すべて同じであることが好ましいが、末端に芳香族アミノ基を有していれば、互いに異なる構造であってもよい。

【0049】

以上のように、一般式(1)にて表される構造を備えているリンカー化合物は、タンパク質分析用の支持体に結合可能なS-S結合と、オリゴ糖鎖等の糖分子

に結合可能なアミノ基とを有している。従って、例えば S-Au 結合により上記リンカー化合物が、タンパク質分析用の支持体上に固定されるので、上記リンカー化合物を介して、上記支持体上に糖分子を強固にかつ簡単に結合させることができる。

【0050】

また、上記リンカー化合物は、多分岐型部位を有し、該多分岐型部位の各末端に芳香族アミノ基を有している。そのため、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるリガンド（後述）を用いることにより、上記支持体表面に効率よく糖分子を集合化させることができる。また、多分岐型部位を有しているので、リンカー化合物を含んでなるリガンドを支持体表面に結合させた場合に、2 次元的に複数の糖分子を再現性よく配列させることができる。

【0051】

さらに、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができる。それゆえ、本発明のリンカー化合物を用いることによって、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0052】

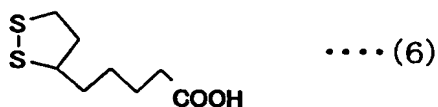
上記リンカー化合物は、以下に示す製造方法によって製造される。すなわち、上記リンカー化合物は、チオクト酸と、芳香族アミノ基末端が保護基によって保護された分岐鎖を 3 鎖又は 4 鎖有する多分岐構造を含んでなるアミン化合物との縮合反応を行い、上記芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護することによって製造される。

【0053】

上記チオクト酸は、下記一般式（6）

【0054】

【化 11】



【0055】

にて表される構造を備えている。

【0056】

また、上記アミン化合物は、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する分岐鎖を含んでいれば特に限定されるものではなく、上記したリンカー化合物の多分岐部位に相当する構造を含んでいればよい。

【0057】

従って、上記分岐鎖は、上記した炭化水素誘導鎖に含まれる芳香族アミノ基の代わりに、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有する以外は、上記炭化水素誘導鎖に含まれる構造を有していればよい。つまり、上記分岐鎖は、炭素及び水素からなる炭化水素鎖にて、一部の炭素や水素が他の原子や置換基に置き換わっていてもよいものである。より具体的には、上記分岐鎖は、保護基によって保護された芳香族アミノ基末端を有するとともに、炭化水素鎖の主鎖構造である炭素-炭素結合 (C-C 結合) の一部が炭素-窒素結合に置き換わっていてもよいものである。

【0058】

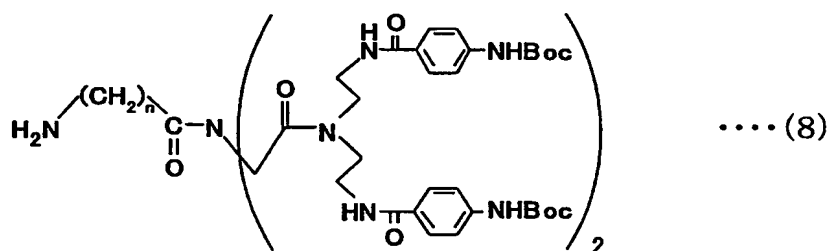
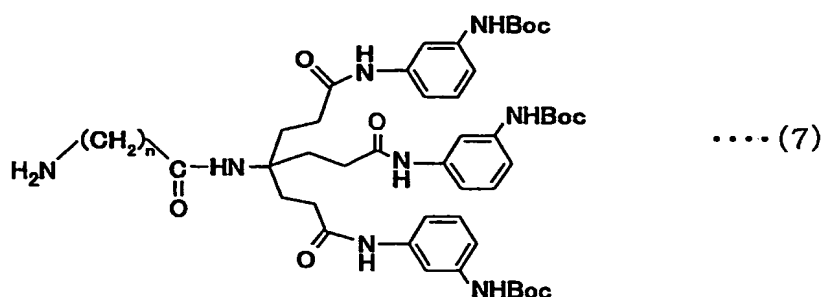
また、上記保護基とは、芳香族アミノ基のアミノ基が上記縮合反応によって反応しないように導入される置換基である。このような保護基は、二級アミノ基の保護基を脱保護する際に影響を受けないものであれば、特に限定されるものではない。上記保護基としては、例えば、*t*-ブトキシカルボニル基 ($-COOC(CH_3)_3$ 基; Boc 基と記載する)、ベンジル基、アリルカルバメート基 ($-COOCH_2CH=CH_2$ 、Alloc 基) 等を挙げることができる。

【0059】

上記アミン化合物としては、例えば、下記一般式 (7) や下記一般式 (8)

【0060】

【化 12】



【0061】

にて表される構造を備えている化合物を挙げることができる。なお、上記一般式 (7)・(8) 中の n は 1 以上 6 以下の整数である。これらのアミン化合物の合成方法については、後の実施例にて詳述する。

【0062】

上記チオクト酸とアミン化合物との縮合反応により、チオクト酸のカルボキシル基 ($-COOH$ 基) と、アミン化合物のアミノ基 ($-NH_2$ 基) とが縮合して、アミド結合が形成される。その後、芳香族アミノ基末端の保護基を脱保護して、保護基を取り外し、芳香族アミノ基にすることによって、上記したリンカー化合物を得ることができる。

【0063】

次に、上記リンカー化合物の芳香族アミノ基に、糖分子が導入されてなるリガンドについて説明する。本発明のリガンドにおいては、リンカー化合物のアミノ基が、糖分子中の平衡によって生じるアルデヒド基又はケトン基と反応し、この反応によって形成されたシッフ塩基を引き続き還元することによって、芳香族アミノ基に糖分子が導入することができる。すなわち、この還元アミノ化反応により、上記リンカー化合物と糖分子とが結合する。

【0064】

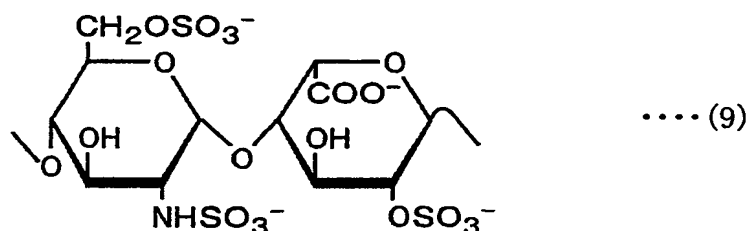
本発明のリガンドに含まれる糖分子は、還元末端を有する還元糖であれば、特に限定されない。例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース等の単糖類、結合している糖の数が2糖～10糖であるマルトース、ラクトース、後述する硫酸化オリゴ糖等のオリゴ糖類、単糖類やオリゴ糖類が組み合わされて糖数が11以上であるヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸等の多糖類を挙げるこゝとができる。

【0065】

また、上記オリゴ糖類として、抗血液凝固活性を有することで知られている硫酸化多糖ヘパリン中の下記一般式(9)

【0066】

【化13】

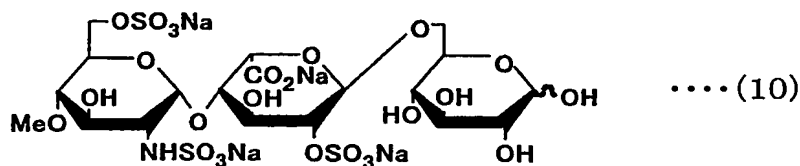


【0067】

にて表される特定の部分二糖構造 (GlcNS6S-IdoA2S) を有する硫酸化オリゴ糖、該硫酸化オリゴ糖の還元末端である水酸基にグルコースを導入してなる下記一般式(10)

【0068】

【化14】



【0069】

にて表される構造を備えているオリゴ糖を挙げるこゝとができる。

【0070】

なお、上記オリゴ糖類や多糖類は、同一の単糖分子からなる単一オリゴ糖や単

一多糖であってもよく、種々の単糖分子やその誘導体からなる複合糖質や、種々の単糖分子やその誘導体、オリゴ糖類を含んでなる複合多糖類であってもよい。また、上記糖分子は、いずれも、自然界から単離・精製して得られる種々の天然の糖であってもよく、人工的に合成された糖であってもよい。

【0071】

具体的には、本発明のリガンドは、前記一般式(4)にて表される構造を備えているものである。この一般式(4)にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式(1)にて表され、Xが前記一般式(2)にて表される構造を備えているリンカー化合物に、上記一般式(10)にて表される構造を備えている糖分子を導入してなるものである。一般式(2)にて表されるXは、3鎖の炭化水素誘導鎖を有している構造を備えているので、一般式(4)にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に3単位の糖分子が結合したものである。

【0072】

また、本発明の他のリガンドは、前記一般式(5)にて表される構造を備えているものである。この一般式(5)にて表される構造を備えているリガンドは、前記一般式(1)にて表され、Xが前記一般式(3)にて表される構造を備えているリンカー化合物に、上記一般式(10)にて表される構造を備えている糖分子を導入してなるものである。一般式(3)にて表されるXは、4鎖の炭化水素誘導鎖を有している構造を備えているので、一般式(5)にて表される構造を備えているリガンドは、上記リンカー化合物に4単位の糖分子が結合したものである。

【0073】

上記のリガンドは、いずれもリンカー化合物と糖分子とを含んでなっているので、リンカー化合物内のS-S結合にて、タンパク質分析用の支持体と、例えばS-Au結合により結合することができる。これにより、このS-Au結合を介して、上記支持体表面に3単位又は4単位の糖分子を集合化して固定化することができる。それゆえ、上記リガンドを用いることによって、タンパク質分析用の支持体表面に2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列し、糖分子の生物活性を

再現性よく評価することが可能になる。

【0074】

上記リガンドは、該リガンドを含むリガンド溶液にタンパク質分析用の支持体を所定時間浸漬する、あるいは、上記支持体にリガンド溶液を注入することによって、上記リガンド（リガンドに含まれるリンカー化合物）のS-S結合を、上記支持体表面の金等とのS-Au結合に変換し、支持体表面に上記リガンドを固定することができる。

【0075】

リガンド溶液に用いる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、メタノール、水、ジメチルアセトアミド（DMAc）や、これらの混合溶媒等を挙げることができる。また、浸漬時間は、0.5時間～12時間程度であればよく、注入量は、0.01mM～1mM程度であればよい。

【0076】

このように、本発明のリガンドは、S-S結合を有しているので、タンパク質分析用の支持体表面に簡単に固定化することができ、上記支持体上に糖分子を簡単に導入することができる。

【0077】

【実施例】

以下、本発明のリンカー化合物及びリガンドの合成について、より詳細に説明する。

【0078】

〔実施例1・リンカー化合物の合成〕

本発明のリンカー化合物である、前記一般式（1）にてnが1であり、Xが前記一般式（2）にて表される構造を備えているリンカー化合物は、以下の手順にて合成した。

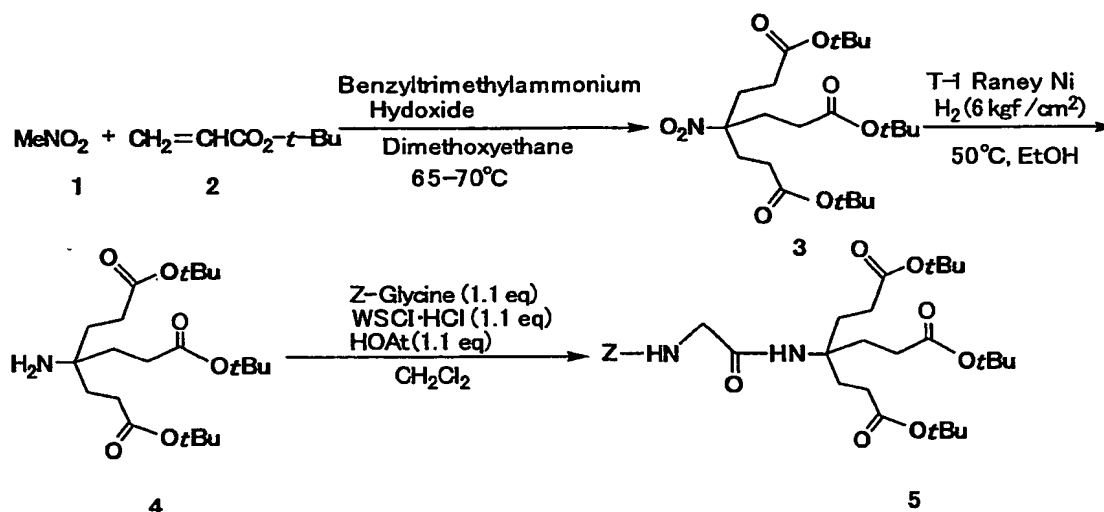
【0079】

下記一般式（11）にて示すように、65℃～70℃のジメトキシエタン中、水酸化ベンジルトリメチルアンモニウム及びの存在下にて、ニトロメタン（化合物1）に対し、3単位のt-ブチルアクリレート（化合物2）をマイケル付加さ

せ、91%の収率にて化合物3を得た。次いで、水素雰囲気下(6 kgf/cm²)、50℃のエタノール中にて、ラネーニッケル(Raney Ni)を用いて、上記化合物3のニトロ基を還元して、98%の収率にて化合物4を得た。その後、CH₂Cl₂中、1.1当量の1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール(式中、HOAt)、1.1当量の水溶性カルボジイミド(式中、WSCl·HCl)の存在下にて、上記化合物4に1.1当量のZ-グリシンを縮合させ、85%の収率にて化合物5を得た。

【0080】

【化15】



....(11)

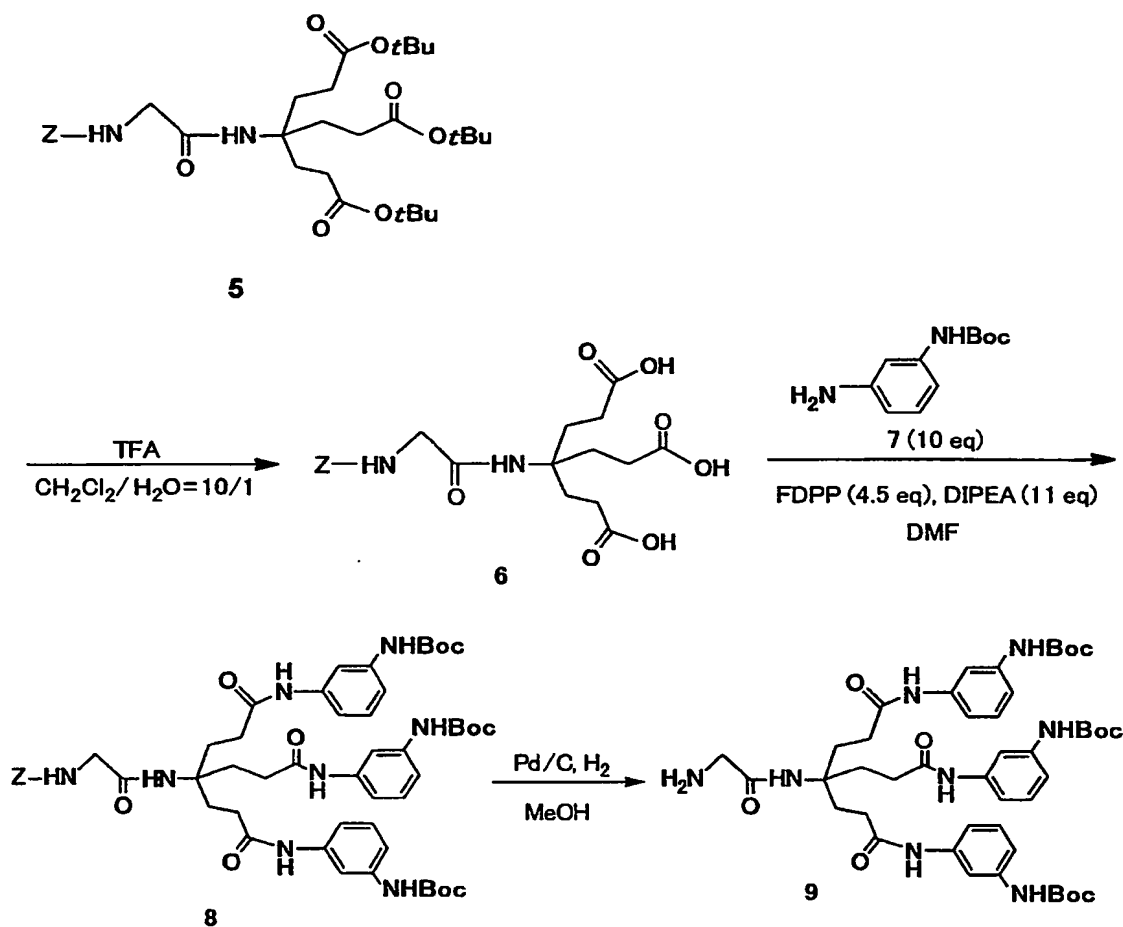
【0081】

次に、下記一般式(12)にて示すように、CH₂Cl₂:H₂O=10:1の混合溶媒中にて、トリフルオロ酢酸(以下、TFAと記載する)を用いて、上記化合物5のtert-ブトキシカルボニル基(-COOC(CH₃)₃基;一般式(12)中、tBu;以下、Boc基と記載する)を脱保護して、収率95%にて化合物6を得た。その後、4.5当量のペンタフルオロフェニルジフェニルホスフェート(式中、FDPP)、1.1当量のジイソプロピルエチルアミン(式中、DIEPA)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)の存在下にて、上記化合物6とBoc基によってアミノ基が保護されたフェニレンジアミン誘導体(化合物7、1.0当量)とを縮合させ、収率99%にて化合物8を得た。続いて、メタノ

ール (図中、MeOH) 中、Pd/C の存在下にて接触水素還元を行い、化合物 8 に縮合した上記 Z-グリシンのベンジルオキシカルボニル基 (式中、Z 基) を脱保護して、収率 79% にて化合物 9 を得た。

【0082】

【化16】



....(12)

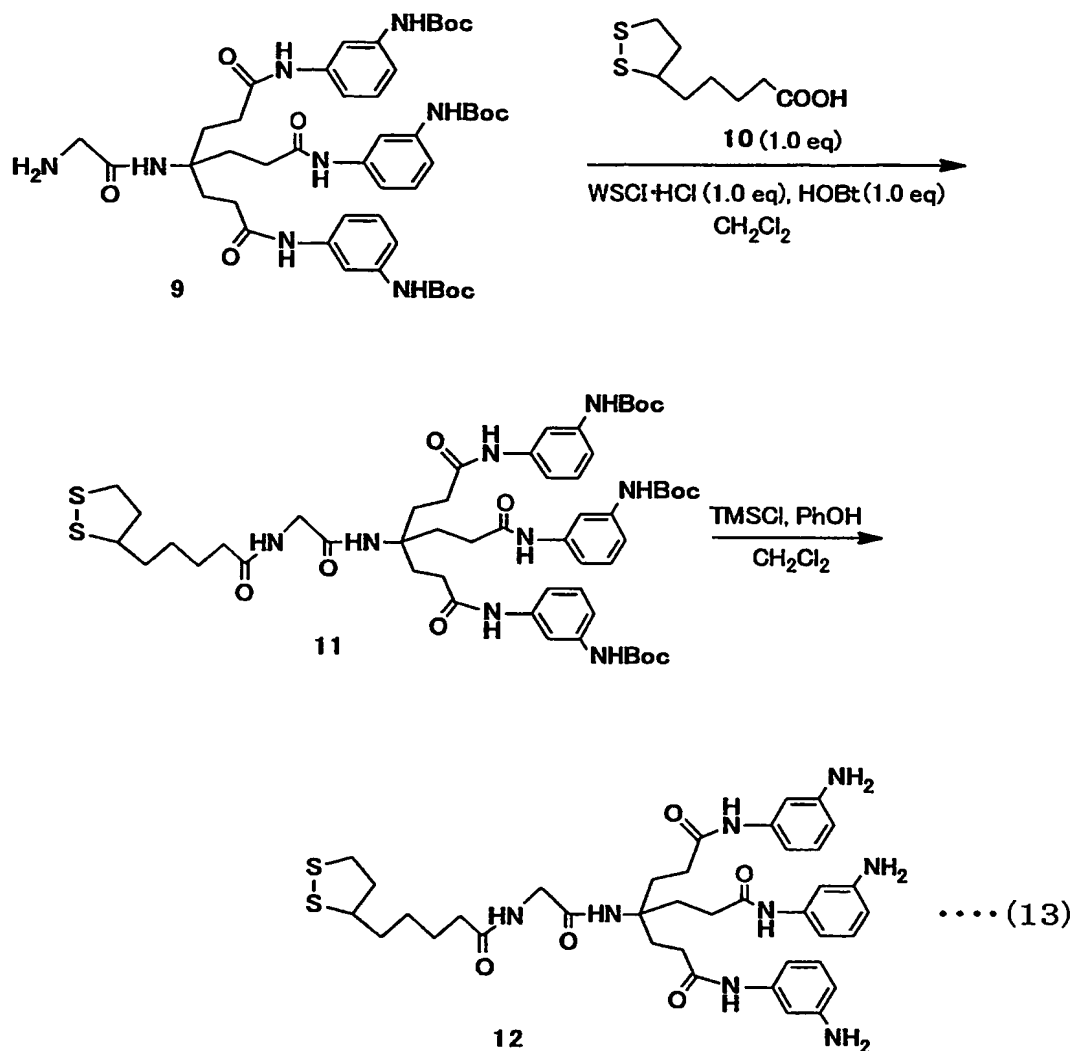
【0083】

さらに、下記一般式 (13) にて示すように、1.0 当量の WSCI · HCl、1.0 当量の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (一般式 (13) 中、HOBT)、 CH_2Cl_2 中、上記化合物 9 を、1.0 当量のチオクト酸 (化合物 10) と縮合させ、収率 75% にて化合物 11 を得た。得られた化合物 11 を、 CH_2Cl_2 中、トリメチルシリルクロリド (式中、TMSCl)、フェノール (PhOH) の存在する酸性条件下にて、上記 Boc 基を脱保護し、芳香族アミノ基を

有する炭化水素誘導鎖を 3 鎖含んでなるリンカー化合物として、化合物 12 を得た (収率 32% 以上)。

【0084】

【化 17】



【0085】

〔実施例 2・リガンドの合成〕

実施例 1 にて得られたリンカー化合物 12 を用いて、前記一般式 (4) にて、 n が 1 である構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

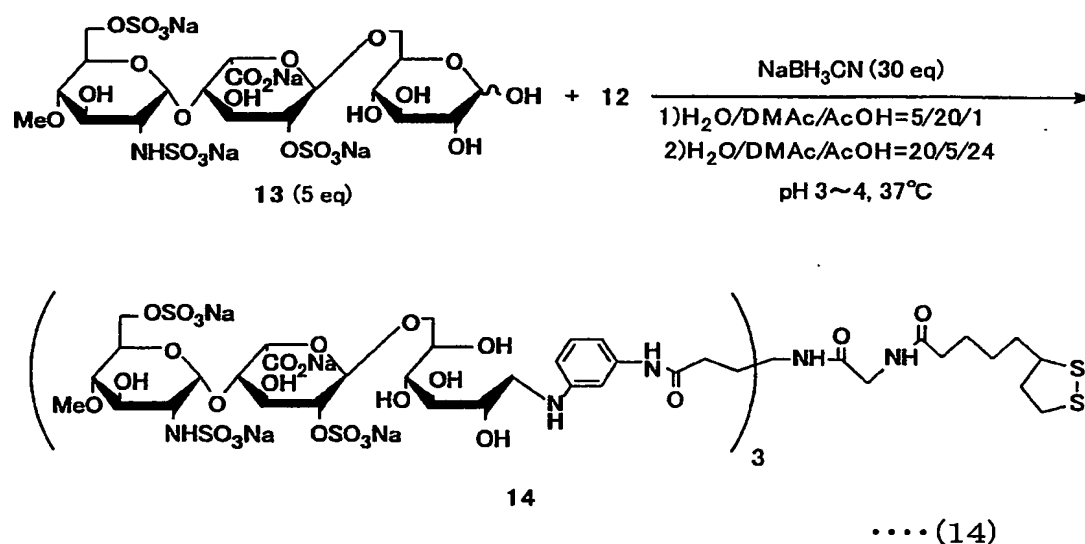
【0086】

下記一般式 (14) に示すように、実施例 1 にて得られたリンカー化合物 12 と、前記一般式 (10) にて表される糖分子である化合物 13 (5 当量) とを、

1) H_2O :ジメチルアセトアミド(式中、DMAc): $\text{AcOH}=5:20:$
 1の溶媒条件下、 $\text{pH}3\sim4$ 、 37°C にて、シッフ塩基を形成し、次いで、2)
 H_2O :DMAc: $\text{AcOH}=20:5:24$ の溶媒条件下、 $\text{pH}3\sim4$ 、 37°C
 にて、30当量の NaBH_3CN を加えて還元アミノ化反応を行った。その後、
 得られた化合物をファルマシアSephadex G-50を用いて、ゲル濾過クロマトグ
 ラフィにより精製し、さらに脱塩処理を行って、糖分子を3単位含んでなるリガ
 ンドとして化合物14を得た。

【0087】

【化18】



【0088】

得られるべき化合物14の質量は3291.28ダルトンであり、飛行時間型
 質量分析計測定によって得られた質量/電荷比(m/z)1008.19のピー
 クは、上記一般式(14)中に示される化合物14が3価のイオン $[\text{M}-12\text{Na}+9\text{H}]^3$
 -として観測されているので、化合物14の構造を確認することができた。

【0089】

【実施例3・リンカー化合物の合成】

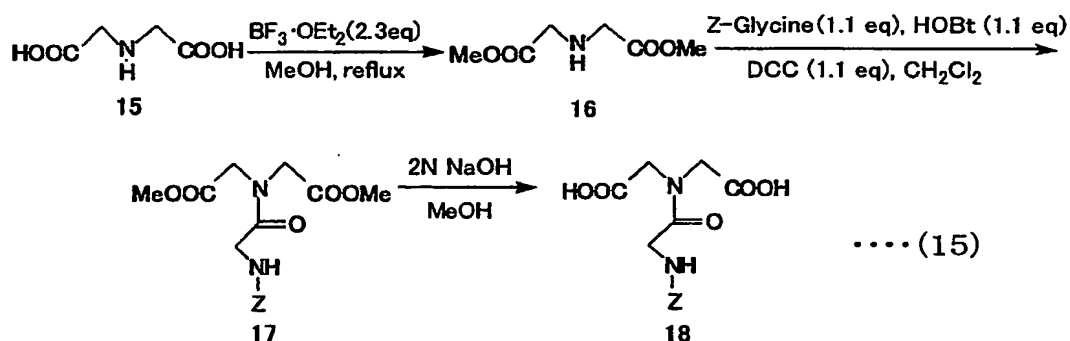
本発明のリンカー化合物である、前記一般式(1)にて n が1であり、 X が前
 記一般式(3)にて表される構造を備えているリンカー化合物は、以下の手順に
 て合成した。

【0090】

下記一般式(15)にて示すように、MeOH中に2.3当量のトリフルオロホウ素・エーテル付加物(式中、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)を加えて、酸性条件下にて還流を行い、ジカルボン酸(化合物15)をエステル化して、収率79%にて化合物16を得た。その後、1.1当量のHOBt、1.1当量のジシクロヘキシルカルボジイミド(式中、DCC)、 CH_2Cl_2 中にて、1.1当量のZ-グリシンを上記化合物16に縮合させ、収率94%にて化合物17を得た。続いて、MeOH中に2NのNaOHを加えて、アルカリ条件下にて化合物17のエステル基を加水分解し、化合物18を収率98%にて得た。

【0091】

【化19】

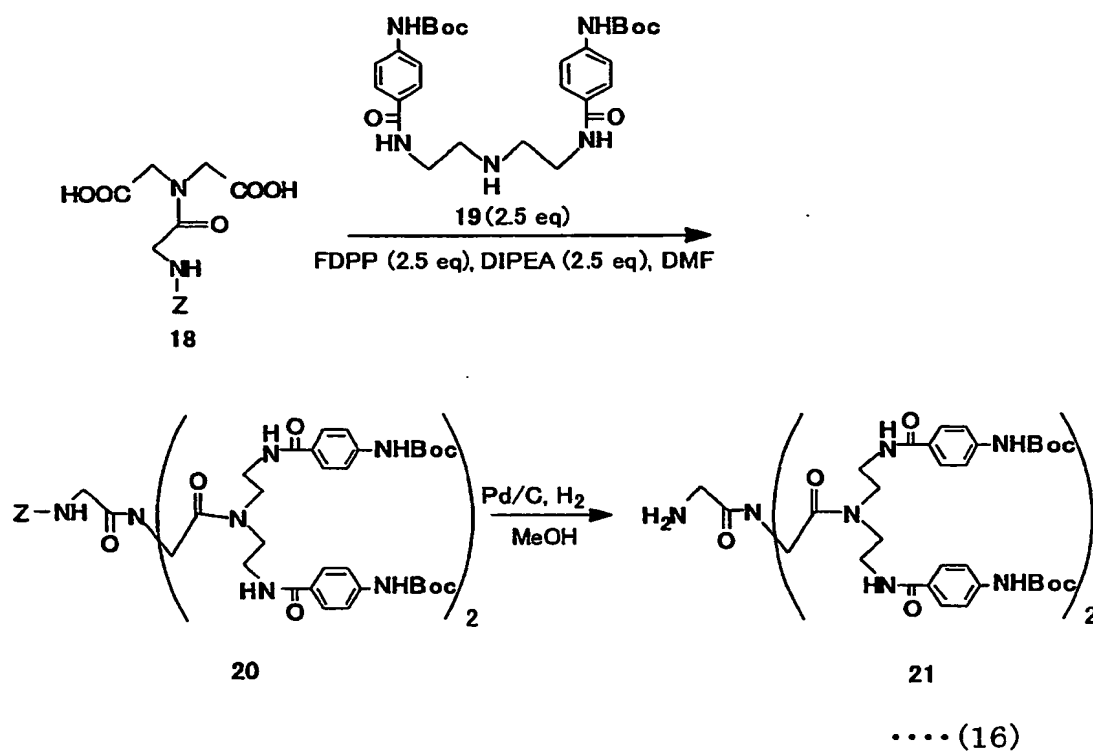


【0092】

次に、下記一般式(16)に示すように、2.5当量のFDPP、2.5当量のDIPEA、DMF中にて、芳香族アミノ基末端をBoc基で保護した化合物19(2.5当量)を上記化合物18に反応させ、収率60%で化合物20を得た。続いて、MeOH中にて、Pd/Cの存在下、接触水素還元を行い、化合物20に縮合している上記Z-グリシンのZ基を脱保護して、収率92%にて化合物21を得た。

【0093】

【化 20】

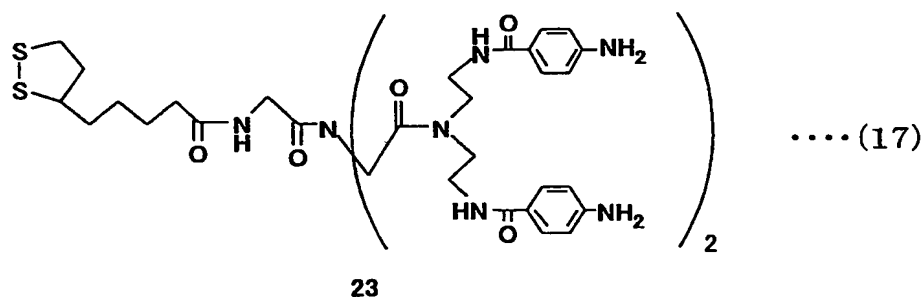
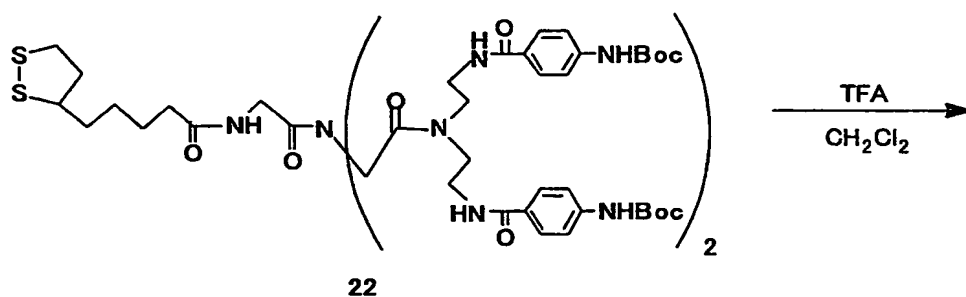
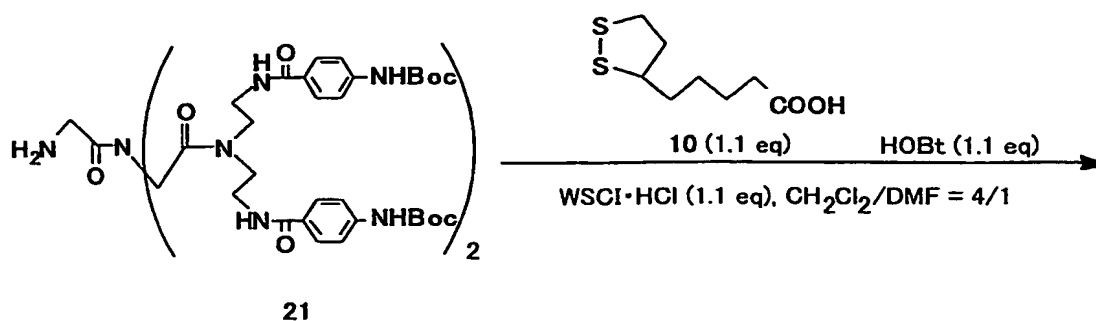


【0094】

さらに、下記一般式 (17) にて示すように、 CH_2Cl_2 :DMF=4:1の混合溶媒中にて、1.1当量のHOBt、1.0当量のWSCl \cdot HClの存在下、上記化合物21を、1.1当量のチオクト酸(化合物10)と縮合させ、収率75%にて化合物22を得た。得られた化合物22を、 CH_2Cl_2 中、TFAの存在する酸性条件下にて、Boc基を脱保護し、芳香族アミノ基を有する炭化水素誘導鎖を4鎖含んでなるリンカー化合物として、化合物23を得た(収率91%)。

【0095】

【化 21】



【0096】

〔実施例 4・リガンドの合成〕

実施例 2 にて得られたリンカー化合物 23 を用いて、前記一般式 (5) にて、 n が 1 である構造を備えているリガンドを以下の手順にて合成した。

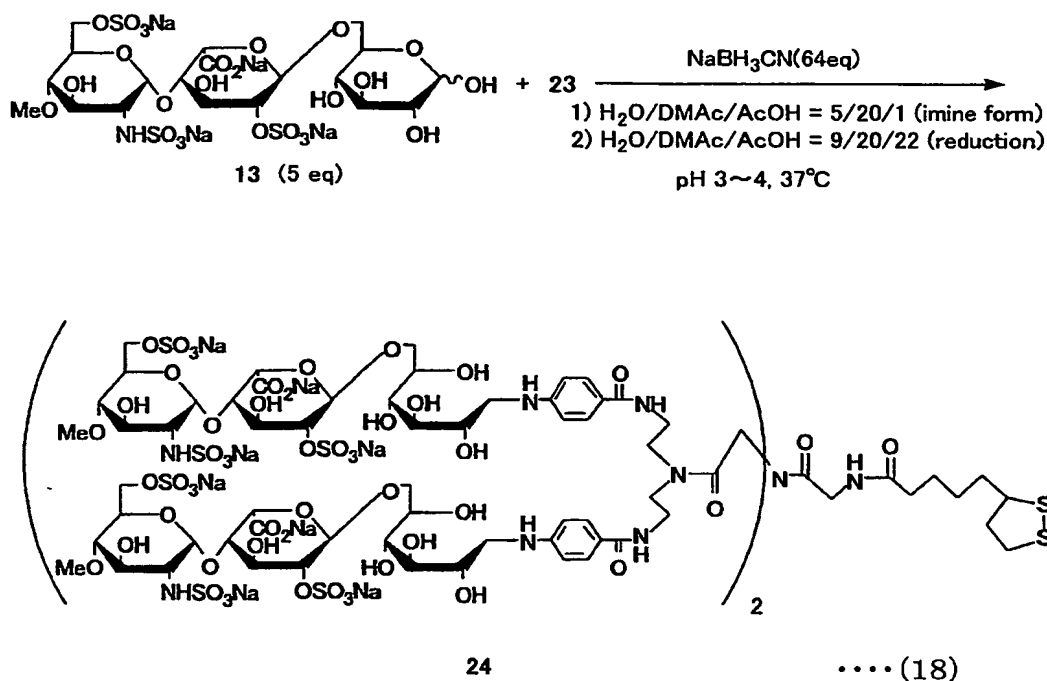
【0097】

下記一般式 (18) に示すように、実施例 2 にて得られたリンカー化合物 23 と、前記一般式 (18) にて表される糖分子である化合物 13 (5 当量) とを、
 1) $\text{H}_2\text{O} : \text{DMAc} : \text{AcOH} = 5 : 20 : 1$ の溶媒条件下、 $\text{pH} 3 \sim 4$ 、 37°C にて、シッフ塩基 (式中、imine form) を形成し、次いで、
 2) $\text{H}_2\text{O} : \text{DMAc} : \text{AcOH} = 9 : 20 : 22$ の溶媒条件下、 $\text{pH} 3 \sim 4$ 、 37°C にて、
 6 4 当量の NaBH_3CN を加えて還元アミノ化反応 (式中、reduction) を行った

。その後、得られた化合物をファルマシアSephadex G-50を用いて、ゲル濾過クロマトグラフィにより精製し、さらに脱塩処理を行って、糖分子を4単位含んだなるリガンドとして化合物24を得た。

【0098】

【化22】



【0099】

得られるべき化合物14の質量は4396.37ダルトンであり、飛行時間型質量分析計測定によって得られた質量/電荷比 (m/z) 1368.93のピークは、上記一般式(18)中に示される化合物24が2価のイオン $[\text{M}-12\text{Na}+10\text{H}]^{2-}$ として観測されているので、化合物24の構造を確認することができた。

【0100】

【発明の効果】

本発明のリンカー化合物は、以上のように、3単位又は4単位の糖分子を導入可能な部位として、芳香族アミノ基末端を有している。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) のセンサチップやアフィニティクロマトグラフィの担体等のタンパク質分析用の支持体に結合可能な部位として、S-S結合を有している。

【0101】

それゆえ、上記リンカー化合物を用いることによって、上記支持体表面上に、3単位又は4単位の糖分子を再現性よく2次元的に配列させることができるという効果を奏する。また、上記リンカー化合物は、タンパク質との非特異的な相互作用の影響をほぼ無視することができるので、糖分子とタンパク質との相互作用を観測する際に、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になる。

【0102】

また、本発明のリガンドは、上記リンカー化合物に糖分子を導入してなるものである。

【0103】

それゆえ、上記リガンドをタンパク質分析用の支持体表面に導入することにより、2次元的に複数の糖分子を再現性よく配列することができるので、糖分子の生物活性を再現性よく評価することが可能になるという効果を奏する。

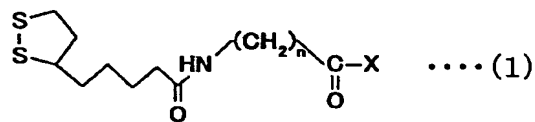
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質分析用の支持体表面上に、糖分子を再現性よく2次元的に配列し得る新規なリンカー化合物、及び、新規なリガンド、並びにこれらの製造方法を提供する。

【解決手段】 リンカー化合物は、下記一般式(1)

【化23】



(式中、nは1以上6以下の整数)にて表される構造を備えている。上記Xは、末端に芳香族アミノ基を有するとともに主鎖に炭素-窒素結合を有していてもよい炭化水素誘導鎖を、3鎖又は4鎖含んでなる多分岐構造部位である構造を備えている。また、リガンドは、上記リンカー化合物に糖分子に糖分子が導入されるものである。

【選択図】 なし

特願 2002-263412

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2002-263412

出願人履歴情報

識別番号

[391012523]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1991年 1月22日
新規登録
鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21番24号
鹿児島大学長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.